

**POSTPARTALE ÄNDERUNG DER RELATIVEN ANTEILE DER
GAMMA - GLOBINKETTEN DES FETALEN HÄMOGLOBINS
UND IHRE KORRELATION ZUR Hb F - Hb A - UMSCHALTUNG**

HUBERT ATTENBERGER

1986

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR : PROF. DR. MED. H. SPIESS

Postpartale Änderung der relativen Anteile der
gamma - Globinketten des fetalen Hämoglobins und ihre
Korrelation zur Hb F - Hb A - Umschaltung.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Hubert Attenberger aus Dorfen

München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. med. M. Jensen
Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.1986

Herrn Prof. Dr. med. M. Jensen

danke ich für die Überlassung dieser Arbeit. Seine
umfassende Unterstützung, freundlich und mit viel
Geduld, waren mir sehr hilfreich und wertvoll.

Frau H. Ritzerfeld

danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und
die praktischen Hilfeleistungen im experimentellen
Bereich.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die menschlichen Hämoglobine

1.1.1. Aufbau, Arten, Synthese

1.1.2. Entwicklungsgeschichtliche Änderung des Globin- musters

1.2. Das fetale Hämoglobin: Die Gamma-Globinketten (G)gamma und (A)gamma

1.3. Fragestellung

- 2. Material und Methoden
 - 2.1. Blutgewinnung
 - 2.2. Globinpräzipitation
 - 2.2.1. Hämolyse
 - 2.2.2. Häm-Abtrennung und Globinpräzipitation
 - 2.3. Gelelektrophorese
 - 2.3.1. Herstellung der Gele
 - 2.3.2. Herstellung der Proben
 - 2.3.3. Elektrophoretische Trennung
 - 2.3.4. Färben und Entfärben der Gele
 - 2.3.5. Bandenidentifizierung
 - 2.4. Densitometrische Auswertung mittels Extinktionsmessung im Spektralphotometer
 - 2.5. Auswertung der Densitometerkurven
 - 2.6. Mehrfachbestimmungen und Kontrollen
 - 2.6.1. Mehrfachbestimmungen
 - 2.6.2. Kontrolle der Peak-Auswertung
 - 2.6.3. Balance der Globine

3. Ergebnisse

3.1. Bandenmuster und Densitometerkurven - Vergleiche

3.1.1. Vergleiche von elektrophoretischen Bandenmustern

3.1.2. Darstellung repräsentativer Densitometerkurven

3.2. Die $(G)\gamma / ((G)\gamma + (A)\gamma)$ - Verhältnisse

3.3. Die Hb F - Hb A(1) - Umschaltung

3.4. Korrelation zwischen dem relativen $(G)\gamma$ - Anteil und dem Prozentsatz an Hb F

4. Diskussion
 - 4.1. Bestimmung der relativen Globinmengen
 - 4.2. Balance der Globine
 - 4.3. Globinbestimmungen nach dem 6. Monat post partum und biosynthetische Verfahren
 - 4.4. Streubreite der perinatalen Hb F Werte
 - 4.5. In vivo Globinzusammensetzung und in vitro Globinsynthese
 - 4.6. Änderung des relativen (G)gamma-Anteils und Zusammenhang mit der Hb F - Hb A(1) - Umschaltung
 - 4.7. Hypothese über die Inaktivierung der (G)gamma- und (A)gamma-Globin-Gene
5. Zusammenfassung
6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die menschlichen Hämoglobine

1.1.1. Aufbau, Arten, Synthese

Das menschliche Hämoglobin ist ein tetrameres Chromoprotein, bestehend aus vier Proteinuntereinheiten (Globinen) mit je einer prosthetischen Gruppe (Häm) (27,37,38). (Abb. 1.1)



Abb. 1.1 Hämoglobin-Modell bei geringer Auflösung. Die alpha-Ketten sind hell, die beta-Ketten dunkel dargestellt. (Nach Perutz (28))

In der Evolution sind aus dem Uroglobin die alpha-, beta-, gamma- und delta-Globine hervorgegangen (10). Die alpha-Kette besteht aus 141 Aminosäuren, die beta-, gamma-, und delta-Kette, auch als Nicht-alpha-Ketten zusammengefaßt, aus 146 Aminosäuren. Die beta-Kette und die gamma-Kette unterscheiden sich in 39 Positionen (33).

Es existieren nebeneinander verschiedene genetisch determinierte Hämoglobine, die sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der einzelnen Globine im tetrameren Hämoglobinmolekül ergeben: Je zwei alpha-Globinketten bilden mit zwei beta-, gamma- oder delta-Globinketten ein Hämoglobinmolekül (31).

Fetales Hämoglobin: Hb F = (alpha(2) gamma(2))

Adultes Hämoglobin: Hb A(1) = (alpha(2) beta(2))

Hb A(2) = (alpha(2) delta(2))

Die Hämoglobinsynthese erfolgt im erythropoetischen System vorwiegend (zu ca. 99 %) im roten Knochenmark. Bald nach Entlassung in die periphere Blutbahn versiegt die Globinsynthese in den Retikulozyten. Aus ihnen gehen die reifen, kernlosen Erythrozyten hervor. Diese sind nicht mehr fähig, Proteine zu synthetisieren. 95 % der Trockensubstanz eines reifen Erythrozyten bestehen aus Hämoglobin (26).

1.1.2. Entwicklungsgeschichtliche Änderung des Globinmusters

Die alpha-Globin-Gene sind als Verband auf dem kurzen Arm von Chromosom Nr. 16 (11,24) lokalisiert. Dieser alpha-Gen-Verband enthält pro haploidem Chromosomensatz aktive Genorte für zwei alpha-Globin-Struktur-Gene (alpha 1, alpha 2) und ein einzelnes embryonales zeta-Gen.

Der beta-Gen-Komplex bzw. Nicht-alpha-Globin-Gen-Verband ist lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr. 11 (12,25) und enthält als aktive Strukturgene ein embryonales Gen, zwei fetale Gene ((G)gamma und (A)gamma), das delta-Gen und das beta-Gen (39). (Abb. 1.2)

Die alpha-Globin-Gene sind das ganze Leben über aktiv, pränatal wie postnatal, mit Ausnahme der allerersten embryonalen Wochen. Die Genexpression der Nicht-alpha-Globin-Gene ist dagegen einer zeitlichen Änderung unterworfen (34).

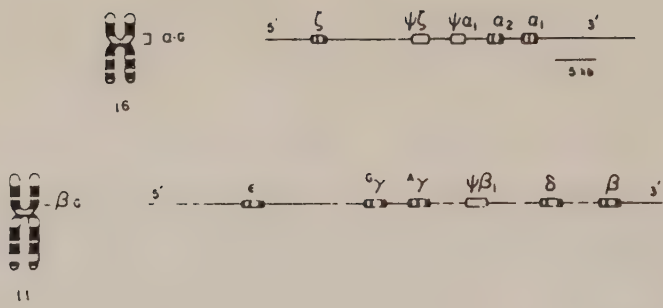


Abb. 1.2 Die chromosomale Lokalisation und die Organisation der menschlichen Globingene im Genom.

Links: Die Position der alpha- und beta-Globingenkomplexe auf Chromosom Nr. 16 und 11.

Rechts: Die Anordnung der Gene in den beiden Komplexen.

kb = Kilobasenpaare

(Aus: Stuart et al. (39))

Die sogenannten embryonalen Hämoglobine transportieren hauptsächlich in den ersten Wochen der präpartalen Entwicklung Sauerstoff. In der 10. - 12. Woche der fetalen Entwicklung dominiert in den Erythrozyten des peripheren Blutes bereits das fetale Hämoglobin, der Anteil der embryonalen Hämoglobine (13,14,19) nimmt dagegen rasch ab. Gleichzeitig kommt es bereits zu einer - wenn auch anteilmäßig geringen - Bildung von "Erwachsenen"-Hämoglobin: d.h. neben der überwiegenden Synthese von gamma-Globin bestehen einige Prozent des Nicht-alpha-Globins bereits aus den beta-Ketten des Hb A.

Cividalli und Mitarbeiter untersuchten die Syntheseraten bei Feten zwischen der 6. und 16. SSW (7). Sie fanden dabei ein beta/gamma-Syntheseverhältnis von 0,06 - 0,10. Bis etwa zur 32. Schwangerschaftswoche beträgt der Anteil von Hb F ca. 90% des Gesamt-Hb's und nimmt dann, zunächst langsam, ab. Jensen untersuchte die in-vitro-Syntheseraten bei Feten von der 16. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt (15,17). Um die 40. Schwangerschaftswoche erreicht Hb F nach kurzem steilen Abfall einen Wert von ca. 60% (18). (Abb. 1.3)

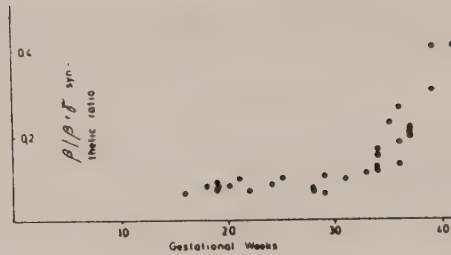


Abb. 1.3 beta-Globin-Synthese im Blut von normalen Feten und Neugeborenen als Anteil der Nicht-alpha-Globin-Synthese
(Aus: Jensen: Fetal globin synthesis ...
(15))

Nahe der Geburt nimmt der Anteil von Hb A(1) rasch zu, und der Anteil von Hb F ab. (Um die Geburt beträgt das Verhältnis Hb A(1) / Hb F etwa 0,3 - 0,5 (22)). Während der ersten drei Monate post partum steigt der Hb A(1)-Anteil weiter steil an, der Anteil an Hb F fällt entsprechend. Nach sechs Monaten ist der Erwachsenenanteil von ca. 97% Hb A(1) erreicht (5), Hb F auf unter 1% gefallen und Hb A(2) auf sein Maximum von etwa 2,5% gestiegen (Abb. 1.4) (42,43). Entsprechend dieser Verteilung werden beim gesunden Erwachsenen in den erythroiden Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes alpha- und beta-Ketten im Verhältnis von nahezu 1 : 1 synthetisiert (36).

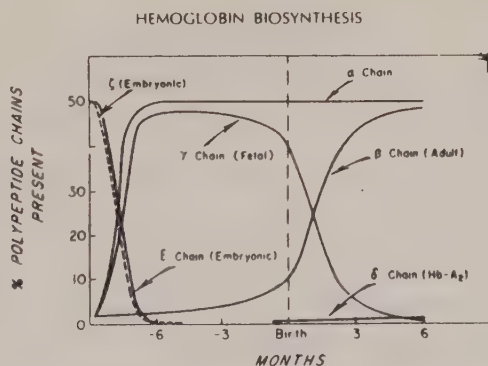


Abb. 1.4 Graphische Darstellung der Veränderungen in der menschlichen Globinsynthese während der pränatalen und neugeborenen Entwicklungsphase. (Huehns et al., Zit. nach Bunn et al. (4,6,13))

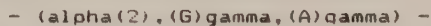
1.2. Das fetale Hämoglobin: Die Gamma-Globinketten (G)gamma und (A)gamma

Die beiden Varianten des Hb F unterscheiden sich in den gamma-Proteinanteilen: Die gamma-Globinketten des menschlichen fetalen Hämoglobins enthalten an Position 136 entweder die Aminosäure Glycin - (G)gamma - oder Alanin - (A)gamma -.

An der Tertiärstruktur des Hb F sind also neben zwei alpha-Ketten entweder zwei (G)gamma-Ketten



eine (G)gamma- und eine (A)gamma-Kette



oder zwei (A)gamma-Ketten



beteiligt.

Der relative Anteil jedes dieser drei möglichen Moleküle ergibt sich wahrscheinlich aus der Binominalverteilung und beträgt beim Feten wegen des Überwiegens von (G)gamma-Globin (s.u.) - der obigen Reihenfolge nach - etwa 49%, 42% und 9%.

Kodiert werden die beiden gamma-Globinketten-Typen durch zwei nicht allele Globin-Gene des (G)gamma-(A)gamma-delta-beta- Gen-Verbandes auf Chromosom Nr. 11 (25,34).

Im fetalen Hb F und dem des Erwachsenen sind jedoch die relativen Anteile der beiden gamma-Globinketten unterschiedlich:

Im fetalen Hb F nimmt (G)gamma 70% des gesamten gamma-Globins ein (35).

$$((G)gamma / ((G)gamma + (A)gamma) = 0,7)$$

In der kleinen Hb F - Fraktion des Erwachsenen ist (G)gamma auf einen Anteil von 40% zurückgegangen.

$$((G)gamma / ((G)gamma + (A)gamma) = 0,4)$$

Die Änderung der gamma-Gen-Expressivität kann demnach in zwei Komponenten aufgeteilt werden: Erstens unterliegen die gamma-Gene einer Repression bei der schon mehrfach untersuchten Umschaltung vom Hb F zum Hb A. Zweitens besteht eine Expressivitätsänderung bezüglich der relativen Anteile beider gamma-Globine.

1.3. Fragestellung

Vollzieht sich der Wechsel in den relativen Beträgen von (G)gamma- und (A)gamma- Globin in einer bestimmten Entwicklungsphase, wie z.B. vergleichbar mit der gamma- zu beta- Globin Umschaltung, oder während eines langsamen allmählichen Prozesses?

In dieser Arbeit wurde das gamma-kettenverhältnis bei Kindern in den ersten sechs Lebensmonaten mit der Fragestellung untersucht, ob eine nicht-proportionale Abnahme der beiden gamma-ketten während der Hb F - Hb A - Umschaltung stattfindet.

Verwendet wurde peripheres Venenblut. Gelelektrophorese und Extinktionsmessung führten zu den erzielten Ergebnissen.

2. Material und Methoden

2.1. Blutgewinnung

Blut wurde - bei entsprechender klinischer Fragestellung, z.B. Bilirubinkontrolle - durch Venenpunktion unter Antikoagulation mit Heparin gewonnen. Waren die Kinder morphologisch unauffällig und die hämatologischen Parameter normal, wurde etwa 1 ml davon für diese Studie verwendet.

Die untersuchten Kinder, mit Ausnahme von einem frühgeborenen Kind in der 31. SSW, waren in der 38. bis 41. Schwangerschaftswoche geboren worden und zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwischen drei Wochen und sechs Monaten alt.

2.2. Globinpräzipitation

Um Artefakte und Proteinabbau durch Autolyse zu vermeiden, wurde unmittelbar nach der Blutentnahme mit der Globinpräzipitation begonnen.

2.2.1. Hämolyse

Das Blut wurde zentrifugiert und der Überstand (Serum) verworfen. Die sedimentierten Zellen (Erythrozyten und Leukozyten) wurden 3 x in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Zum gewaschenen Sediment wurden 5 Volumen 0,005 M MgCl(2)-Lösung unter Schütteln hinzugegeben (Hämolyse). MgCl(2) lysiert gezielt die Erythrozyten und verhindert dadurch weitgehend Verunreinigungen durch Leukozytenproteine.

2.2.2. Häm-Abtrennung und Globinpräzipitation

Nach 5 min Zentrifugieren (*) wurde das klare Hämoly-
sats abpipettiert, sein Volumen bestimmt, und bei
-20 Grad C tropfenweise und unter Schütteln zum fünf-
fachen Volumen eines Gemisches aus 2 ml konzentrier-
ter HCl, 98 ml Aceton und 8 Tropfen Mercaptoäthanol
gegeben (Häm-Abtrennung und Globinpräzipitation)
(23). Es wurde 5 min zentrifugiert und der Überstand
verworfen. Das sedimentierte Globin wurde nun 3 x mit
Aceton (-20 Grad C) gewaschen und anschließend mit
N(2) getrocknet.

Das getrocknete Globin wurde bis zur Weiterverarbei-
tung bei -20 Grad C gelagert.

(*) Zentrifuge: Eppendorf Zentrifuge Typ 5412

2.3. Gelelektrophorese

2.3.1. Herstellung der Gele

Für die Elektrophorese wurden Rund-Gele nach der Methode von Rovera et al. (30) und Modifikation nach Jensen (15) verwendet.

In 25 ml 8 M Harnstofflösung wurden 3 g Acrylamid und 93 mg Bisacrylamid gelöst. Unter ständigem Rühren wurden 0.125 ml TMED (Tetramethyläthylendiamin) (*), 0,5 ml Triton X-100 (**), 1,25 ml 96 % Essigsäure, 2 ml H₂O und 0,8 ml 2 % Ammoniumperoxodisulfat (200 mg/10 ml) in der angegebenen Reihenfolge hinzugegeben.

Das fertige Gemisch wurde entgast, dann in die Elektrophoreseröhrchen gegossen und vorsichtig mit Aqua dest. überschichtet. In den folgenden 12 Stunden lief so die begonnene Polymerisation ab.

(*) TMED, Serva Feinbiochemika, Heidelberg

(**) Triton X-100, speziell gereinigt für Szintillationstechnik, Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Die Hinzugabe des nichtionischen Detergens Triton X-100 zur Pufferlösung ermöglicht die Aufspaltung der (G)gamma- und (A)gamma- Globine, wie Rovera et al. (30) feststellten, sowohl durch Säulenchromatographie als auch mittels Gelelektrophorese (15).

Am Beispiel der Harnstoff-Carboxymethyl-Cellulose-Säulenchromatographie nach Clegg et al. (8) mit einem veränderten Phosphatgradienten (flacher Gradient im ersten Teil der Elution) bei ansteigender Phosphatkonzentration und Hinzugabe von 4 % Triton X-100 zum Puffer wird die Trennung der gamma-Ketten deutlich (Abb. 2.1A,B).

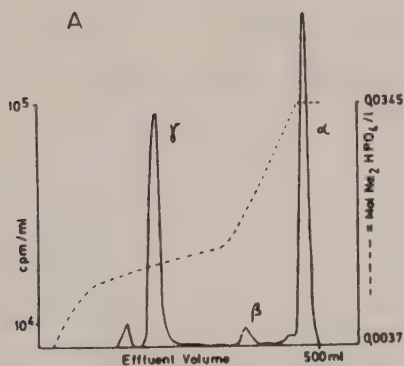


Abb. 2.1A Radiochromatogramm von Globin von normalem fetalen Blut. (Aus: Jensen: Fetal globin synthesis ... (15))

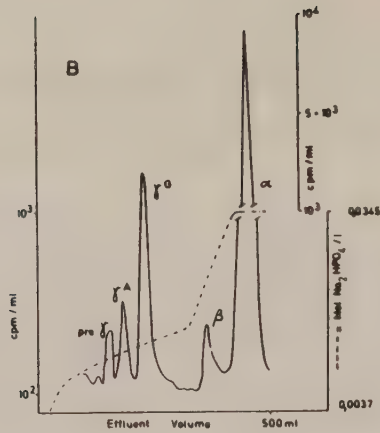


Abb. 2.1B Gleiche Probe wie in Abb. 2.1A unter Hinzugabe von 4 % Triton X 100 zur Pufferlösung; Phosphatgradient unterscheidet sich geringfügig von dem in Abb. 2.1A. (Aus: Jensen: Fetal globin synthesis ... (15))

2.3.2. Herstellung der Proben

Die Herstellung der Proben:

Der Probenpuffer, in dem eine Spatelspitze Pyronin (ca. 3 mg) gelöst war, bestand aus einem Gemisch aus 10 ml 8 M Harnstofflösung, 0,8 ml 8 % Essigsäure und 0,8 ml 8 % Mercaptoäthanol.

Getrocknetes Globin wurde abgewogen und in Probenpuffer im Verhältnis 2:1 (2 micro g/micro l) gelöst. 20 micro g hiervon wurden als Proben für die Elektrophorese verwendet.

2.3.3. Elektrophoretische Trennung

Saulenelektrophorese:

Die Gele wurden in den mit 5 % Essigsäurepuffer gefüllten Elektrophoresebehälter getaucht und die verschiedenen Proben mit einer Mikropipette auf die Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 110 Volt für ca. 7 Stunden.

2.3.4. Färben und Entfärben der Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 16 Stunden in einer 0,05 % Coomassieblue-Lösung fixiert und gefärbt. Diese bestand aus 150 ml Methanol, 30 ml konzentrierter Essigsäure, 320 ml Aqua dest. und 250 mg Coomassie blue (1).

Das Entfärben erfolgte durch Diffusion in derselben Trägerlösung, jedoch ohne Coomassie blue, unter mehrfachem Erneuern der Lösung.

Die getrennten Globinfractionen stellten sich nun in einem blauen Bandenmuster dar (Abb. 2.2).

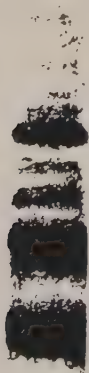


Abb. 2.2 Beispiel eines typischen Bandenmusters von einem 110 Tage alten Kind.

2.3.5. Bandenidentifizierung

Zur Bandenidentifizierung wurden folgende zwei Experimente durchgeführt:

1. gamma-Globin spaltet sich in zwei Banden auf:

alpha-, beta-, und gamma-Globin wurde mittels Carboxy-Methyl-Cellulose Harstoff Saulenchromatographie nach Clegg et al. (8,29) getrennt und gereinigt, und separat elektrophoretisch, wie oben beschrieben, weiterbehandelt.

Gereinigtes alpha- und beta-Globin ergab einzelne Banden an verschiedenen Positionen. Gereinigtes gamma-Globin spaltete sich dagegen in typischer Weise in zwei Banden - entsprechend der (G)gamma- und der (A)gamma-kette - auf (Abb. 2.3).

2. Lokalisation der delta-Bande:

Da Zweifel bestanden, ob die delta-Kette des Hb A(2) nicht zusammen mit der (G)gamma-Kette in diesem System wandert, wurden Gobin aus Neugeborenen-Hämolysat, gereinigtes Hb A(2) und eine Mischung aus beiden Proben elektrophoretisch getrennt.

Das Neugeborenenhämolysat zeigte das typische Bandenmuster der getrennten alpha-, beta-, (G)gamma-, und (A)gamma-Ketten, das gereinigte Hb A(2) die deutlich getrennten Banden der alpha und delta-Ketten. Die Probenmischung ergab fünf Banden und es konnte durch Vergleich der Bandenmuster bewiesen werden, daß sich die delta-Bande zwischen der (G)gamma- und (A)gamma-Bande ansiedelt (Abb. 2.4).

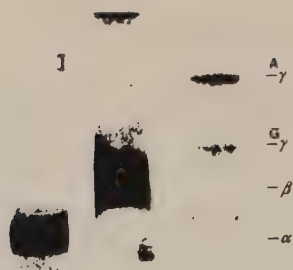


Abb. 2.3 Elektrophorese von alpha-, beta- und gamma-Globin (von links nach rechts), getrennt und gereinigt durch CMC-Harnstoff-Säulenchromatographie. (Jensen et al. (16))



Abb. 2.4 Elektrophoretische Globin-Trennung von Neugeborenen-Hämolysat, gereinigtem Hb A(2), und einer Mischung aus beiden Proben (von links nach rechts). (Jensen et al. (16))

2.4. Densitometrische Auswertung mittels Extinktions- messung im Spektralphotometer

Zur densitometrischen Auswertung wurden die Gele im Spektralphotometer <*> bei einer Spaltbreite von 0.1 mm und einer Wellenlänge von 550 nm, entsprechend dem Absorptionsmaximum von Coomassie blue, gemessen. Die densitometrischen Messwerte (aus den Extinktionswerten) der Bandenmuster wurden dabei auf einen angeschlossenen Schreiber <*> übertragen und in Form von entsprechenden Kurven aufgezeichnet (Abb. 2.5).

Den getrennten Globinen konnten nun die dazugehörigen Peaks zugeordnet werden.

-
- <*> Spektralphotometer: Model 25 Spectrophotometer,
Beckman Instruments, München
- <*> Schreiber: Beckman Instruments, München

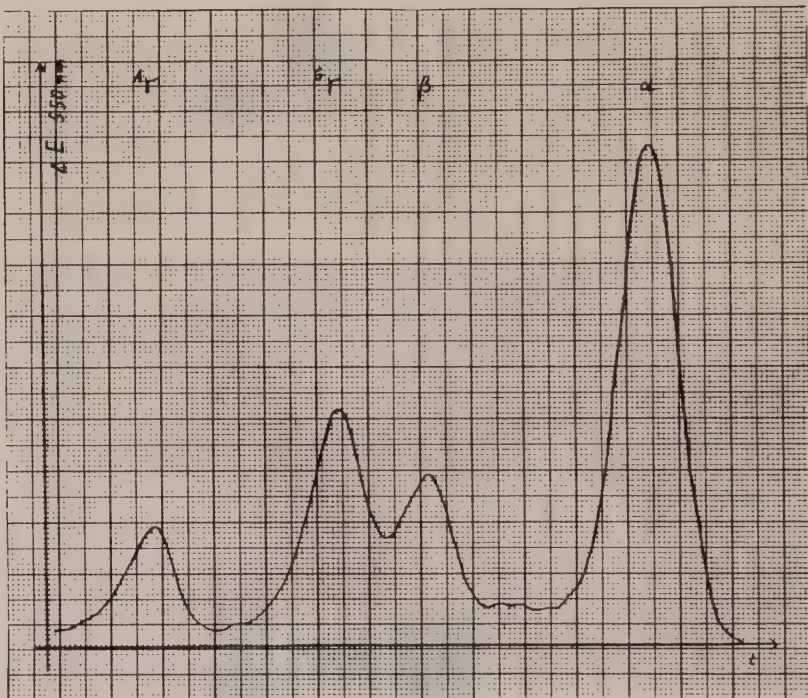


Abb. 2.5 Beispiel einer typischen Densitometerkurve
von einem 31 Tage alten Kind.
(Maßstab 1:2)

2.5. Auswertung der Densitometerkurven

Die Peaks, deren Flächeninhalte den einzelnen Globinmengen proportional sind, wurden auf schweres, hochtransparentes Pergamentpapier gepaust, ausgeschnitten, und auf einer Präzisionswaage <*> gewogen.

Aus den so erhaltenen, den alpha-, beta-, (G)gamma-, (A)gamma- und delta-Globinen entsprechenden mg-Angaben wurden folgende Verhältnisse (Quotienten) für diese Arbeit gebildet: <***

$$- \quad (G)\gamma / ((G)\gamma + (A)\gamma),$$

um eine mögliche entwicklungsmäßige Änderung dieses Verhältnisses festzustellen:

$$- \quad \gamma / (\gamma + \beta),$$

um den Gesamtanteil der gamma-Globine an den Nicht-alpha-Globinen zu erhalten, also auch eine Kontrolle und evtl. Bestätigung der Hb F- Hb A(1)-Umschaltung für den hier untersuchten Lebensabschnitt:

*> Präzisionswaage: Sartorium Type 2414,
Sartorius Werke GmbH, Göttingen

$(G)\gamma / (\gamma + \beta)$

und

$(A)\gamma / (\gamma + \beta)$.

errechnet aus den beiden obigen Verhältnissen, um die Abnahme der gamma-Ketten einzeln im untersuchten Entwicklungszeitraum darzustellen.

*** Die delta-Werte lagen bei allen Proben weit unter der Fehlergrenze und wurden nicht berücksichtigt.

2.6. Mehrfachbestimmungen und Kontrollen

2.6.1. Mehrfachbestimmungen

Die Elektrophorese mit der densitometrischen Messung und anschließenden Auswertung wurde für jede getrocknete Globin-Probe mehrfach (zwei- bis fünffach), je nach zur Verfügung stehender Globin-Menge, durchgeführt. Verwendet wurden die Mittelwerte (der Quotienten) aus den Mehrfachbestimmungen.

Der Mittelwert der Standardabweichungen lag bei den (G)gamma/gamma-Mittelwerten bei:

$$m = 0,030; s = \pm 0,014 ;$$

bei den gamma/(gamma+beta)-Mittelwerten bei:

$$m = 0,040; s = \pm 0,045 .)$$

2.6.2. Kontrolle der Peak-Auswertung

Die Peaks wurden überschlagsmäßig integriert, wobei ein Dreieckes durch Anlegen von Tangenten an die Wendepunkte konstruiert wurde. Die Ergebnisse wurden mit den Werten aus der Gewichtsbestimmung verglichen. Die Abweichungen hierbei lagen unter 2 %. (Abb. 2.7)

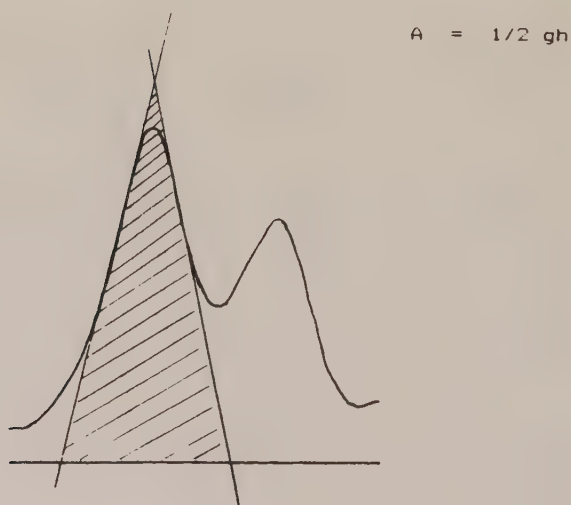


Abb. 2.7 Konstruktion eines Dreiecks durch Anlegen von Tangenten an die Wendepunkte.

2.6.3. Balance der Globine

Den Werten der alpha-Banden wurden die Summen der Werte der dazugehörigen Nicht-alpha-Banden gegenübergestellt: Der Quotient $(\beta + \gamma) / \alpha$ ist ein Ausdruck für die Balance der Globine, d.h., in wie weit alpha- und Nicht-alpha-Ketten, die sich ja zu definierten Hb-Tetrameren zusammensetzen, in gleichem Ausmaß vorhanden sind.

Es errechnete sich ein Mittelwert über den Balancequotienten von allen Proben von $m = 1,25$ mit einer empirischen Standardabweichung von $s = \pm 0,32$. Dieses Ergebniss wird weiter unten diskutiert.

7. Ergebnisse

3.1. Bandenmuster und Densitometerkurven - Vergleiche

3.1.1. Vergleiche von elektrophoretischen Bandenmustern

Die elektrophoretischen Globinbandenmuster eines Feten, eines 4 Wochen und eines 20 Wochen alten Kindes sind zum Vergleich in Abb. 3.1 dargestellt.

Es zeigt sich nur wenig beta-Globin beim Feten, und es ist deutlich sichtbar, daß die (G)gamma-Bande die (A)gamma-Bande an Intensität übertrifft. Einen Monat nach der Geburt sind die gamma-Ketten zu Gunsten der beta-Ketten abgeschwächt. 4 Monate nach der Geburt ist der gamma-Globinanteil schon sehr klein, aber es ist erkennbar, daß nun die (A)gamma-Bande die (G)gamma-Bande übertrifft. Auch die delta-Bande des Hb A(2) wird jetzt sichtbar.

Bei Kindern über dem 6. Monat wird der Anteil der gamma-Ketten so gering, daß zuverlässige Messungen mit dieser Methode nicht mehr zu erreichen waren.

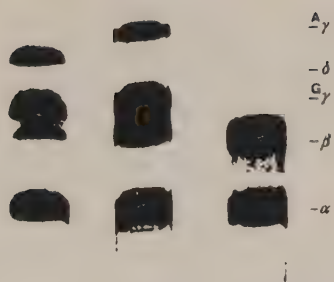


Abb. 3.1 Globinelektrophorese von Blut eines Feten,
und zweier Kinder im Alter von 30 und 136
Tagen. (von links nach rechts) (16)

Abb. 3.2 gibt einen Überblick über elektrophoretische Bandenmuster in dem in dieser Arbeit untersuchten Lebensabschnitt.

Die Zunahme von (A)gamma- gegenüber (G)gamma-Globin wird - mit zunehmendem Alter - anhand der Änderung der relativen Färbeintensität der entsprechenden Banden erkennbar. Gleichzeitig kommt es zu einer stetigen Abnahme des Gesamt-gamma-Globinanteils bzw. relativen Zunahme des beta-Globinanteils. Im 4. bis 5. Monat etwa wird auch die delta-Bande sichtbar.

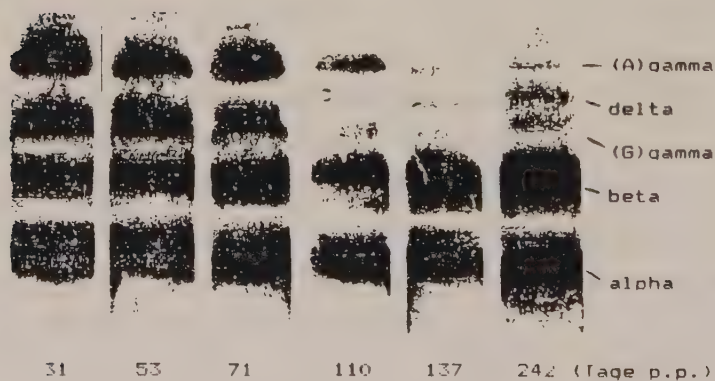


Abb. 3.2 Überblick densitometrischer Globinbandenmuster von Kindern im Alter von 31 bis 242 Tagen. (Umschlagpunkt des (G)gamma/gamma-Verhältnisses etwa beim dritten Bandenmuster von links.)

3.1.2. Darstellung repräsentativer Densitometerkurven

Die Abb. 3.3 bis 3.5 zeigen beispielhaft typische Densitometerkurven von Globinelektrophoresen bei Kindern im Alter von 33, 71, und 110 Tagen.

Im Altersbereich um 4 Wochen post partum besitzt der (G)gamma-Peak - abgesehen vom alpha-Peak - den größten Flächeninhalt. Später, etwa zwischen der 8. und 12. Woche, dominiert schon der beta-Peak des Hb A(1), und die geschrumpften gamma-Peaks sind in ihrem Ausmaß grob vergleichbar. Mit fortschreitendem Alter verkleinern sich die gamma-Peaks weiter - der (G)gamma-Peak schwindet schneller als der (A)gamma-Peak - und nähern sich ab dem 6. Monat der Fehlergrenze dieser Methode.

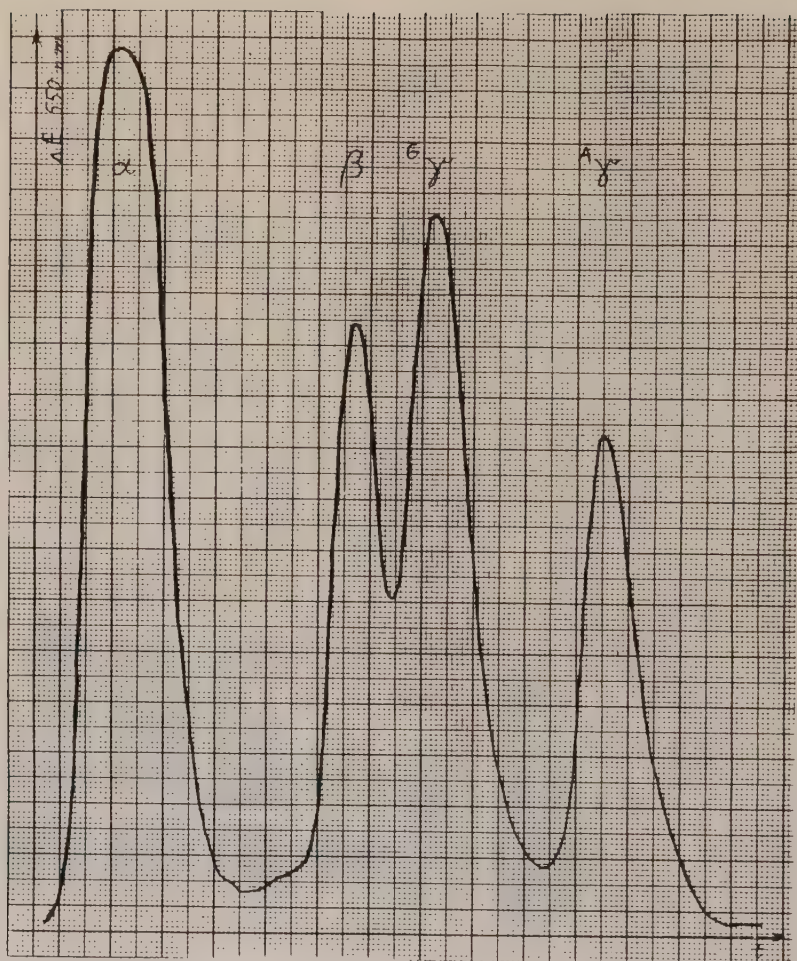


Abb. 3.3 Auftrennung der Globine aus den peripheren Blutzellen eines 33 Tage alten gesunden Kindes.

$$\frac{(G)\gamma}{(G)\gamma + (A)\gamma} = 0.63$$

$$\frac{\gamma}{\beta + \gamma} = 0.69 \quad (\text{Hb F})$$

$$\frac{(\beta + \gamma)}{\alpha} = 1.49 \quad (\text{Balance})$$

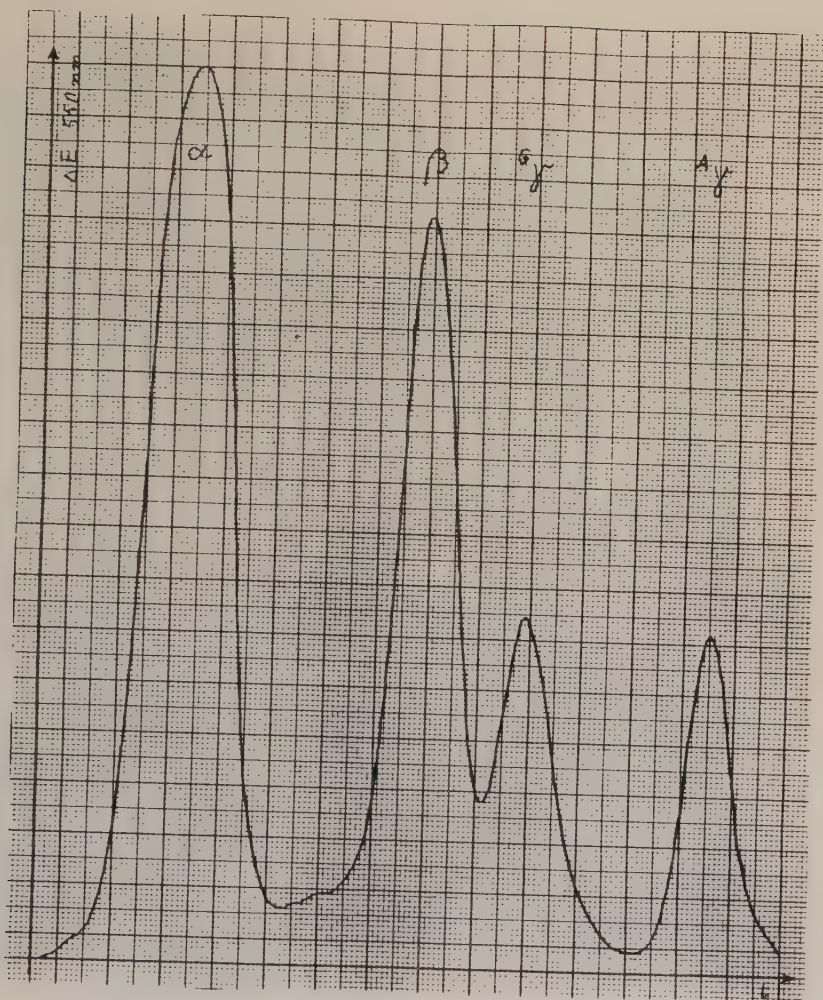


Abb. 3.4 Auftrennung der Globine aus den peripheren Blutzellen eines 71 Tage alten gesunden Kindes.

$$(G)\gamma / ((G)\gamma + (A)\gamma) = 0.56$$

$$\gamma / (\beta + \gamma) = 0.43 \quad (\text{Hb F})$$

$$(\beta + \gamma) / \alpha = 1.21 \quad (\text{Balance})$$

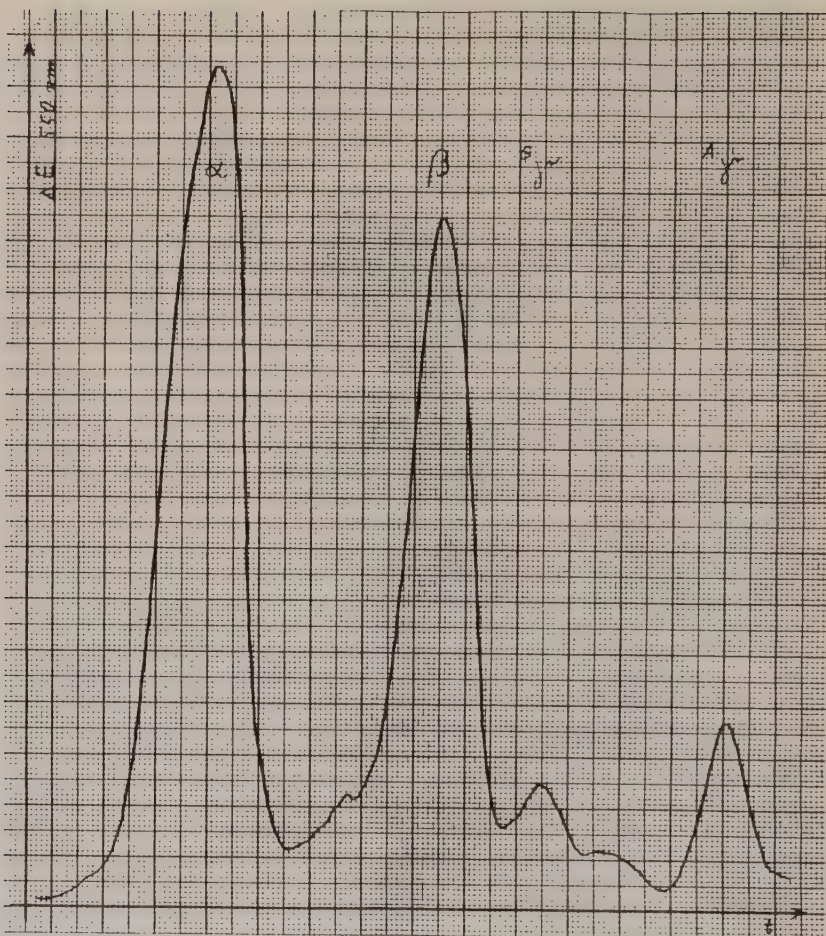


Abb. 3.5 Auftrennung der Globine aus den peripheren Blutzellen eines 110 Tage alten gesunden Kindes.

$$(G)\gamma / ((G)\gamma + (A)\gamma) = 0.41$$

$$\gamma / (\beta + \gamma) = 0.25 \quad (\text{Hb F})$$

$$(\beta + \gamma) / \alpha = 1.04 \quad (\text{Balance})$$

3.2. Die $(G)\gamma/((G)\gamma+(A)\gamma)$ - Verhältnisse

In Tab. 3.1 sind die relativen γ -Globinketten-Anteile der 16 untersuchten Kinder zusammengestellt.

Nr.	Alter in Tagen	$(G)\gamma/((G)+(A)\gamma)$
1	24	0.71
2	29	0.59
3	31	0.70
4	33	0.63
5	39	0.68
6	47	0.61
7	53	0.70
8	59	0.64
9	71	0.56
10	93	0.52
11	99	0.49
12	110	0.41
13	120	0.62
14	137	0.42
15	143	0.49
16	189	0.40

Tab. 3.1 γ -Globinkettenverhältnisse in
Abhängigkeit vom postpartalen Alter.

Die Beziehung - relativer (G)gamma-Globinanteil am Gesamt-gamma-Globin (Ordinate) in Abhängigkeit vom Alter des Kindes (Abszisse) - ist in Abb. 3.6 graphisch dargestellt. Das frühgeborene Kind Nr. 13, das im Alter von 120 Tagen untersucht wurde, hatte einen für sein Alter ungewöhnlich hohen Anteil an (G)gamma-Globin, und wurde bei der Berechnung der Regressionsgerade nicht berücksichtigt (siehe Diskussion).

Im hier untersuchten Zeitraum zeigt sich ein stetiger Abfall des (G)gamma/((G)gamma+(A)gamma) Quotienten:

Die Regressionsgerade lautet:

$$(G)gamma/gamma = -0.00195 \times \text{Tage} + 0.721$$

Es besteht eine signifikante Korrelation von $r = -0.89$

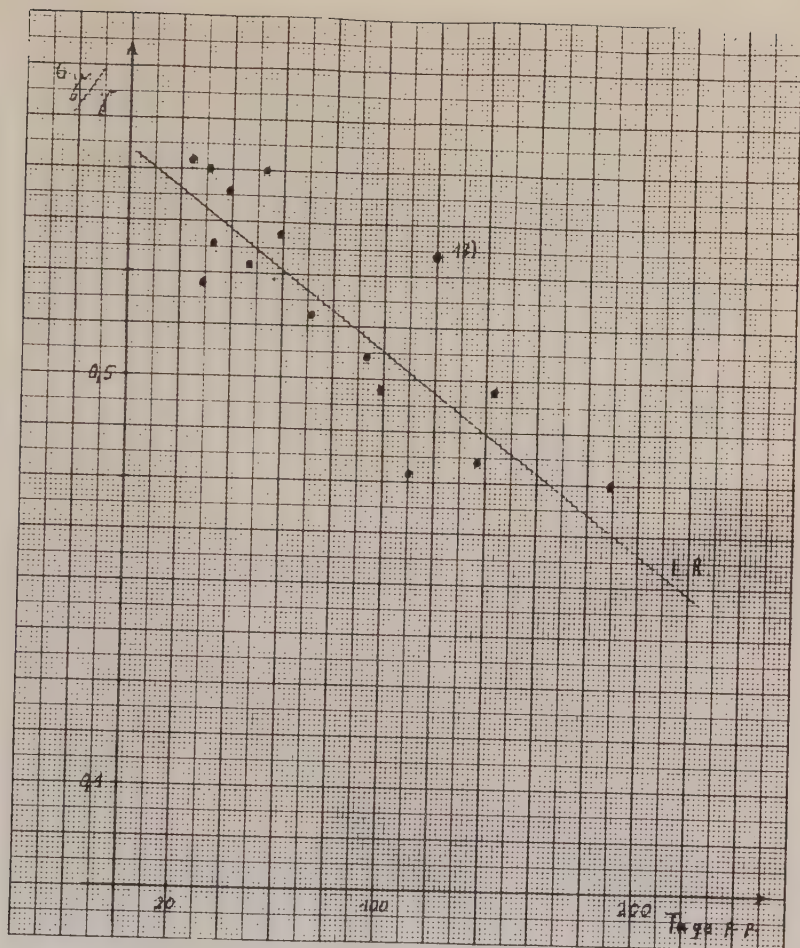


Abb. 3.6 Das $\frac{G. \gamma}{G. \gamma + (A) \gamma}$ -
Verhältnis in den ersten 6 Monaten post
partum. $r = -0.89$
(Nr. 13 bei der linearen Regression nicht
berücksichtigt (Diskussion).)

3.3. Die Hb F - Hb A(1) - Umschaltung

Der $\gamma/(\gamma+\beta)$ - Quotient $\times 100$ gibt den Prozentanteil des Hb F an, und ist ein Indikator für die Hb F zu Hb A(1) Umschaltung - $\text{Hb F}/(\text{Hb F} + \text{Hb A})$ - . (Die delta-Bande bleibt unberücksichtigt.) Die Werte der 16 untersuchten Kinder sind in Tab. 3.2 zusammengefaßt und in Abb. 3.7 graphisch dargestellt.

Es ergibt sich ein stetiger Abfall des Hb F Anteils im untersuchten Zeitraum:

Die Regressionsgerade lautet: $\langle * \rangle$

$$\gamma/(\gamma+\beta) = -0.00441 \times \text{Tage} + 0.789$$

Es besteht eine signifikante Korrelation von $r = -0.94$

$\langle * \rangle$ Das in der 31. Schwangerschaftswoche geborene Kind (Nr. 13) mit einem im Alter von 120 Tagen ungewöhnlich hohen Hb F - Anteil wurde für die Berechnung der Regressionsgerade nicht herangezogen.

Nr.	Alter in Tagen	$\gamma/(\gamma+\beta)$
-----	----------------	-------------------------

1	24	0.62
2	29	0.58
3	31	0.68
4	33	0.69
5	39	0.63
6	47	0.65
7	53	0.69
8	59	0.57
9	71	0.43
10	93	0.40
11	99	0.18
12	110	0.25
13	120	0.43
14	137	0.10
15	143	0.24
16	189	0.02

Tab. 3.2 $\gamma/(\gamma+\beta)$ - Quotient in Abhängigkeit vom Alter (24 bis 189 Tage post partum) der 16 untersuchten Kinder.

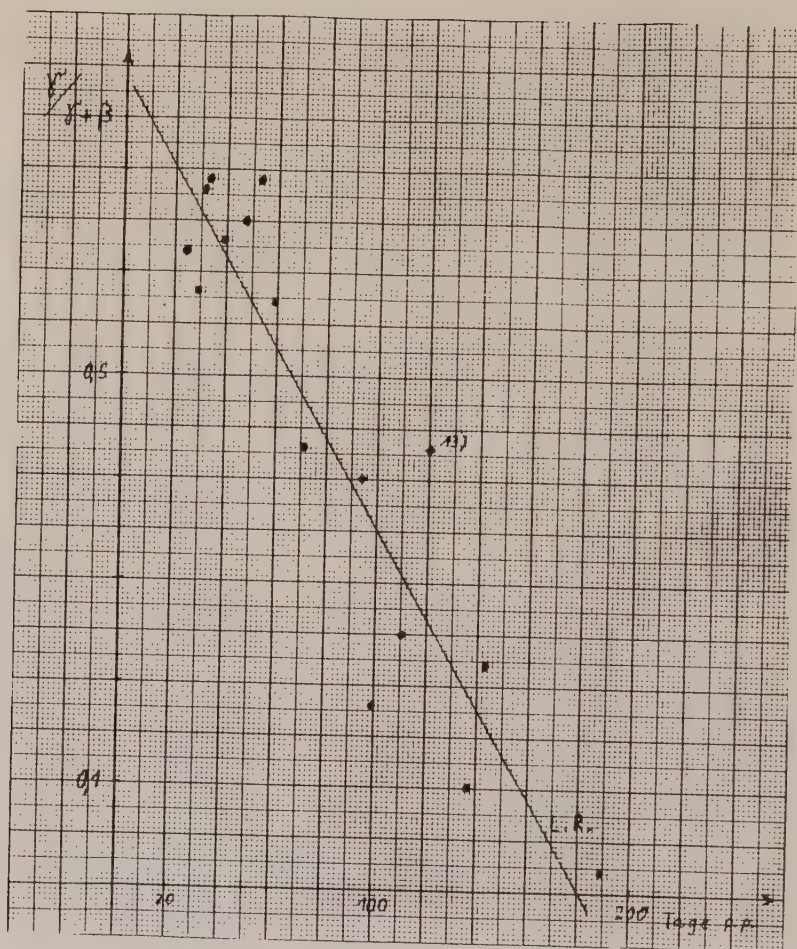


Abb. 3.7 $\gamma/(\gamma + \beta)$ Quotient als Funktion
des Alters. $r = -0.94$
(Nr. 13 bei der linearen Regression nicht
berücksichtigt.)

3.4. Korrelation zwischen dem relativen (G)gamma - Anteil und dem Prozentsatz an Hb F

Der Zusammenhang zwischen dem relativen Wechsel der (G)gamma- und (A)gamma- Globine und der Hämoglobin F- zu Hämoglobin A-Umschaltung in vivo ist in Abb. 3.8 dargestellt. Der $(G)gamma/((G)gamma+(A)gamma)$ - Wert ist gegen den $gamma/(gamma+beta)$ - Wert aller untersuchten Kinder aufgetragen.

Die Regressionsgerade lautet:

$$(G)gamma/gamma = 0.429 \times gamma/(gamma+beta) + 0.382$$

Es besteht eine signifikante Korrelation von $r = 0.94$

In den ersten Monaten post partum besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Abnahme an Hb F bzw. Zunahme an Hb A und der Änderung der relativen Anteile von (G)gamma- und (A)gamma- Globin - so wie Hb F abnimmt, so fällt (G)gamma - Globin relativ zugunsten von (A)gamma - Globin -.

Die Koppelung dieser beiden Änderungen wird auch durch die Werte des frühgeborenen Kindes bestätigt, welches sowohl einen für sein Alter hohen Hb F - Anteil als auch großen relativen (G)gamma - Anteil besitzt.

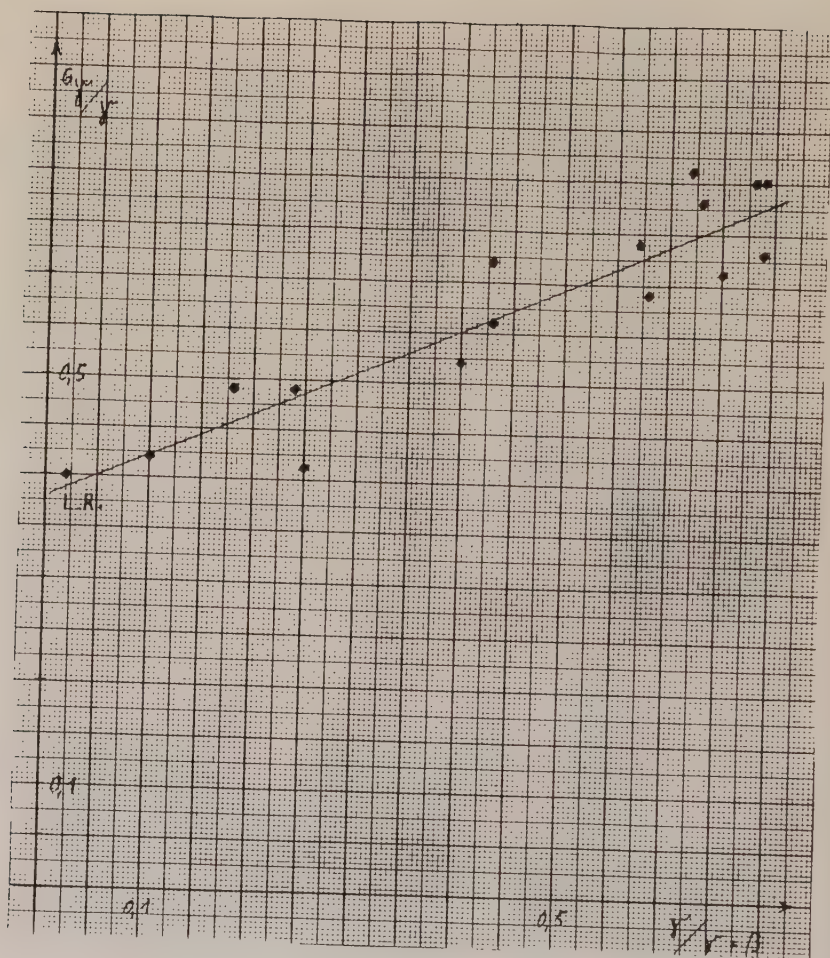


Abb. 3.8 Korrelation von $G\gamma/\gamma$ und $\gamma/(\gamma+\beta)$.

Das $\gamma/(\gamma+\beta)$ - Verhältnis ist ein Indikator des $Hb F/(Hb F + Hb A)$ - Verhältnisses. $r = 0.94$

4. Diskussion

4.1. Bestimmung der relativen Globinmengen

Messungen von Absolutmengen sind wenig sinnvoll und sehr schwierig bzw. aufwendig, weil

- bezüglich der Zellzahl verlustfreies Arbeiten erforderlich ist, wobei der unterschiedliche HbE noch unberücksichtigt bleibt.
- sich in Bezug auf die Proben Ungenauigkeiten aus der Proteinbestimmung in konzentriertem Harnstoff ergeben.
- die Globinmengen im Neugeborenen- und frühen Kindesalter einer großen Variationsbreite unterliegen (31).

Die aus den Relationen gewonnenen Werte bleiben dagegen von derartigen Einflüssen und individuellen Schwankungen, welche die Hämoglobinemenge betreffen, unbeeinflusst, und ergeben relativ zuverlässige Aussagen über das Entwicklungsstadium.

Auf die aufwendige Messung absoluter Globinmengen wird verzichtet, alleine entscheidend sind die Verhältnisse der Mengen zueinander.

4.2. Balance der Globine

Die Balance der Globine unterlag einer gewissen Schwankungsbreite, der alpha-Globinanteil war zu-
meist geringer als der nicht-alpha-Globinanteil.

Schwankungen der Balance werden u.a. auch von Kan und Mitarbeitern (20,21), die mit anderen Methoden arbeiteten, in der Umschaltperiode beschrieben.

Die Verschiebung der Balance ist möglicherweise auch geringfügig bedingt durch die densitometrische Auswertung: Die Extinktionswerte erhält man durch den Absorptionsgrad eines Lichtbündels. Sie entsprechen der in einem schmalen Kreisausschnitt (Spaltbreite) enthaltenen Globinmenge. Es wird also nicht das gesamte, auf der jeweiligen Kreisfläche des Rundgels gelegene Globin gemessen. Dieses kann einen kleinen Fehler bei sich stark unterscheidenden Konzentrationen verursachen.

4.3. Globinbestimmungen nach dem 6. Monat post partum und biosynthetische Verfahren

Bei Kindern über dem 6. Lebensmonat wurde der Anteil der gamma-Ketten so gering, daß zuverlässige Messungen mit der in dieser Arbeit angewandten Methode nicht mehr erreicht werden konnten.

gamma-Globin-Biosyntheseraten ließen sich nach der Methode von Jensen et al. (16) (siehe 4.5.) für den Zeitraum der ersten Lebenswochen nicht bestimmen. Der Grund dafür lag bei den immer geringer werdenden gamma-Globinmengen nach der Geburt. Eine ausreichende Radioaktivität des nach der o.a. Methode mit H(3)-Leucin markierten gamma-Globins war nicht mehr zu erzielen.

Es war somit lediglich die Globinmengenbestimmung (Protein) aus den peripheren Erythrozyten bis zum 6. Monat post partum möglich.

4.4. Streubreite der perinatalen Hb F Werte

Die Hämoglobinumschaltung von 90 % Hb F beim Feten zu weniger als 1 % Hb F beim Erwachsenen ist mehrfach untersucht worden. Verschiedene Quantifizierungsverfahren wurden angewendet, u.a. auch biosynthetische Methoden (3,16,41,42).

Um den Zeitraum der Geburt beträgt der Anteil des Hb F bei einem Neugeborenen beziehend auf Angaben verschiedener Autoren (3,16,41,42) in etwa zwischen 90 % und 60 % des Gesamthämoglobins. Diese Schwankungen sind hauptsächlich durch die verschiedenen Gestationsalter zum Zeitpunkt der Geburt, in geringerem Maße durch plazentare Stoffwechselfaustauschbedingungen, genetische Konstitutionen und weitere nicht im einzelnen verifizierbare Einflüsse, sowie durch die unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden bedingt und zu erklären - wie z. B. die Proteinbestimmung in peripheren Erythrozyten und die in vitro Proteinsynthese durch Retikulozyten -.

Allgemein kann gesagt werden, daß der Hb F-Anteil unabhängig ist von der Geburt, jedoch signifikant korreliert mit dem Gestationsalter (3).

4.5. In vivo Globinzusammensetzung und in vitro Globinsynthese

Die Hämoglobinsynthese erfolgt in den Zellen des erythropoetischen Systems. Abgesehen von der embryonalen und der frühen fetalen Phase findet die Blutbildung hauptsächlich im roten Knochenmark statt. Nach Entlassung der Retikulozyten in die periphere Blutbahn bleibt die Hämoglobinsynthese nur noch für kurze Zeit bestehen. Die Retikulozyten differenzieren sich zu reifen Erythrozyten. Dabei geht mit dem Zellkern auch der "Apparat der Proteinsynthese" (Ribosomen ect.) verloren.

Die Globinzusammensetzung im peripheren Blut in der Hb F zu Hb A Umschaltungsperiode ist nicht nur allein abhängig vom Kontrollmechanismus der Globinsynthese, sondern auch von der turn-over Rate der Erys, abhängig von der Lebensdauer und der Neubildungsrate. Der Großteil des Hämoglobins ist in Zellen enthalten, die aufgehört haben Hämoglobin zu synthetisieren. Diese Zellen unterlagen in ihren eigenen individuellen Synthesephasen verschiedenen Regulationseinflüssen: deswegen läßt das anteilige Vorkommen der einzelnen Globine in den altersmäßig gemischten Zellpopulationen keinen unmittelbaren Rückschluß zu auf die anteiligen Syntheseraten von Globinen, die die einzelnen Zellen in ihrer Synthesephase aufweisen.

Anderungen der relativen Raten der gamma- und beta-Globinsynthese folgen, nach einer bestimmten lag-Periode, meßbare Veränderungen in der Globinzusammensetzung.

Die in-vitro-Globinsynthese, wie sie u.a. Jensen et al. (16) durchführten, brachte bis jetzt nur für den präpartalen Lebensabschnitt - hoher gamma-Globinanteil - aussagekräftige Ergebnisse. Dabei wurde - durch Inkubation mit radioaktiven Aminosäuren - der Regulationsstand der Genexpression nur für eine spezifische Population junger Zellen, den Retikulozyten und jungen Erythrozyten, gemessen.

Durch Anwendung dieser Methode zeigte sich, daß in der 32. bis 34. Schwangerschaftswoche die beta-Globinsynthese anzusteigen beginnt, die gamma-Globinsynthese dagegen entsprechend abnimmt. Die Aktivität der gamma-Globin-Gene in den vom roten Knochenmark neu entlassenen Zellen wird von dieser Zeit an zunehmend geringer (15,40).

4.5. Änderung des relativen (G)gamma - Anteils und Zusammenhang mit der Hb F - Hb A(1) - Umschaltung

Im Gegensatz zum Wissen um die perinatale gamma-zu-beta-Globin-Umschaltung fehlten Informationen über den Wechsel in den relativen Anteilen von (G)gamma- und (A)gamma- Globin, nämlich von 70 % (g)gamma-Globin im fetalen Hb F zu etwa 40 % im Hb F des Erwachsenen.

Kürzliche Arbeiten mit erythroiden Stammzellkulturen haben eine positive Korrelation gezeigt zwischen den gamma/(gamma+beta)- und den (G)gamma/((G)gamma+(A)gamma)- Verhältnissen in einzelnen erythroiden Populationen (9,40). Die relativen Verhältnisse der (G)gamma- und (A)gamma- Globine bei Feten in der 20. Schwangerschaftswoche und bei Neugeborenen wurden von Chr. Schneider (32) gemessen. Sowohl die Anteile der Proteine als auch die Synthese in der jungen Population wurden bestimmt. Die Ergebnisse zeigten bei beiden Verfahren keine meßbaren Unterschiede in der Zusammensetzung des Hb F bei den Feten und den Neugeborenen. Das (G)gamma/gamma- Verhältnis lag jeweils bei 0,7. Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch von Alter et al. erzielt (1,15).

In dieser Arbeit wurden die (G)gamma- Anteile von Kindern bis zum Alter von 189 Tagen durch Messung der Globinzusammensetzung berechnet. In den Monaten nach der Geburt ergab sich ein stetiges Abnehmen des (G)gamma/gamma- Verhältnisses, welches gut mit dem noch vorhandenen Anteil an Hb F korrelierte. So hatte das eine frühgeborene Kind, welches einen noch hohen Anteil an Hb F hatte, auch ein hohes (G)gamma/gamma- Verhältnis. Das (G)gamma/gamma- Verhältnis von 0.4 wird etwa zur selben Zeit erreicht, zu der die gamma- zu-beta- Umschaltung vollendet wird, und bleibt zeitlebens bestehen.

Hieraus kann gefolgert werden, daß die Änderung des (G)gamma/gamma- Verhältnisses im Zeitraum der Hb F zu Hb A Umschaltung verläuft, und daß beide Phänomene in einer besonderen Weise miteinander verbunden sind. Während dieser postpartalen Phase scheint somit die Inaktivierung der beiden gamma- Gene disproportional zu sein, indem sie ein sich änderndes Verhältnis produzieren.

Auf der anderen Seite zeigen die (G)gamma/gamma-Verhältnisse bei Feten in der 20. Schwangerschaftswoche und bei Neugeborenen keinen meßbaren Unterschied. Da aber der Anteil an Hb F und somit an gesamtem gamma-Globin bei Neugeborenen bereits geringer ist als bei Feten um die 20. Schwangerschaftswoche, ergibt sich daraus, daß die Abnahme der beiden gamma-Globine im pranatalen Zeitraum nahezu proportional verläuft bzw. nicht meßbar von der Proportionalität abweicht.

4.7. Hypothese über die Inaktivierung der (G)gamma- und (A)gamma- Globin-Gene

Eine mögliche Erklärung der Inaktivierung der beiden gamma-Globin-Gene, welche beide Folgerungen mit in Betracht zieht - proportionale Abnahme in der späten Schwangerschaft und möglicherweise in den ersten Wochen nach der Geburt, und disproportionale Abnahme danach -, wird im folgenden versucht:

Es ist anzunehmen, daß die Inaktivierung der gamma-Globin-Gene in der Hb F - Hb A Umchaltungsperiode nicht plötzlich und/oder synchron in allen Stammzellen des erythropoetischen Systems beginnt. Eine allmähliche Abnahme ist in Anlehnung an viele biologische Abläufe wahrscheinlich und für den Beginn eines Änderungsvorgangs typisch. Diese Einleitungsphase wird gefolgt von einem relativ raschen Wechsel - lineare Phase -, der in einer Auslaufphase langsam zum Stillstand kommt. Dieser Sachverhalt kann graphisch in einem sigmoidalen Kurvenverlauf dargestellt werden.

Es wird angenommen, daß die Inaktivierung der gamma-Gene während der Hb F - Hb A - Umschaltung, bestätigt durch die Ergebnisse verschiedener oben erwähnter Autoren (1,15,16), durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf beschrieben werden kann. Fordert man, ausgehend vom Inaktivierungsverlauf bei der gemeinsamen Betrachtung der beiden gamma-Gene (= Kurvenverlauf des Hb F), sowohl für die Inaktivierung des (G)gamma als auch des (A)gammaGens einen sigmoidalen Kurvenverlauf - die Addition beider gamma- Ordinatenwerte ergibt den des Hb F -, dann ergeben sich relative (G)gamma- und (A)gammaVerhältnisse, welche gut mit den experimentellen Werten, auch zwischen den Endpunkten, übereinstimmen: Der (G)gamma/gammaQuotient ändert sich anfangs wenig, fällt zwischen dem 1. und 4. Monat nach der Geburt nahezu linear ab, und erreicht dann in asymptotischer Annäherung den Endwert von 0.4 (Abb. 4.1 u. 4.2).

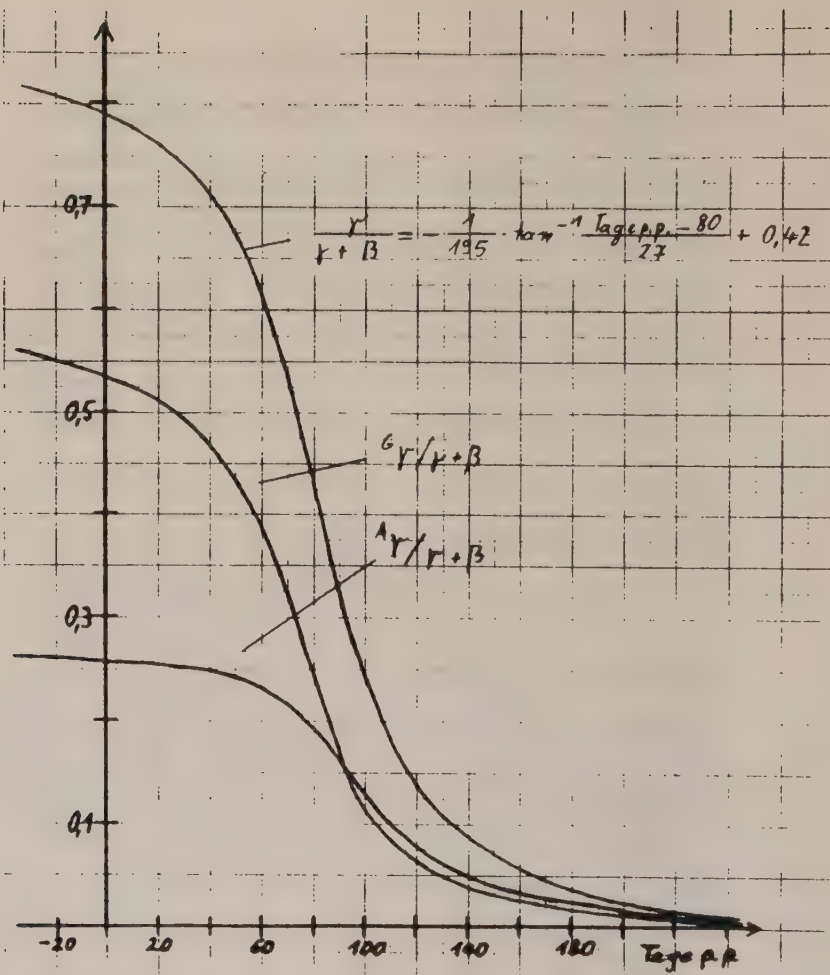


Abb. 4.1 Hypothetische Zeitkurven der Inaktivierung der (G)gamma- und (A)gamma- Globin-Gene, unter der Annahme eines sigmoidalen Kurvenverlaufs der Gesamt-gamma-Globin-Gen-Inaktivierung.

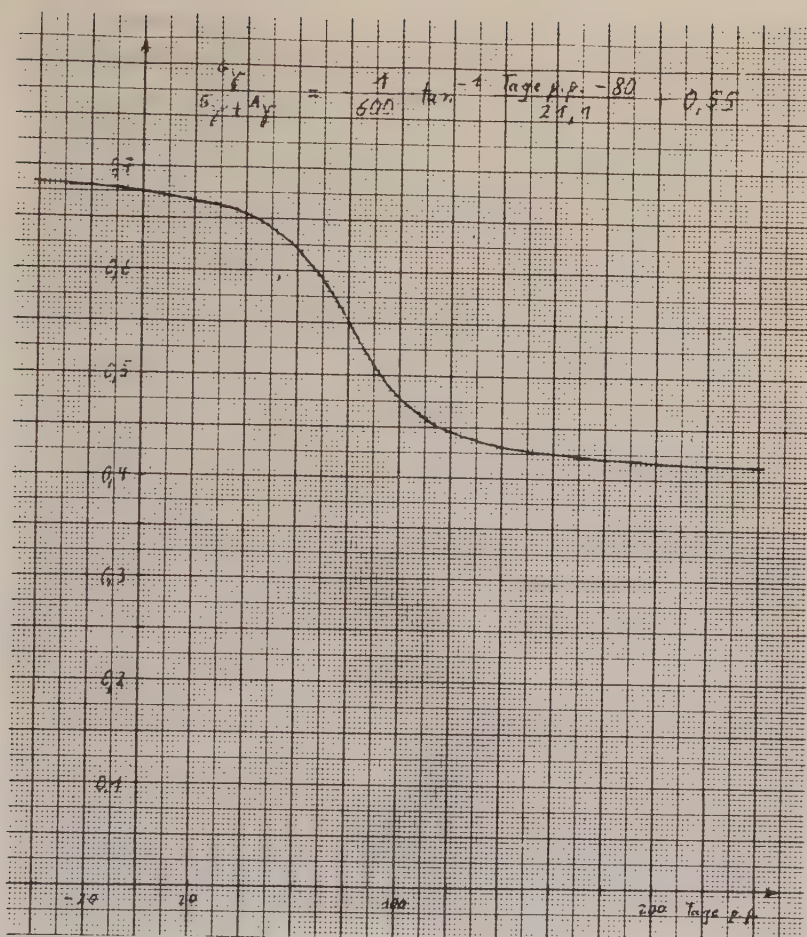


Abb. 4.2 Hypothetische Zeitkurve des $\frac{(G)\gamma}{(G)\gamma + (A)\gamma}$ - Verhältnisses - errechnet aus obigen Kurvenverläufen -, welches sich bis nach der Geburt wenig ändert und dann nahezu linear abfällt.

Dieses Schema würde erklären, warum der (G)gamma/gamma-Quotient bei Feten und Neugeborenen unterschiedslos annähernd den Wert 0.7 annimmt, wohingegen der prozentuale Anteil von Hb F sich in diesem Zeitraum von 90 % bis 60 % bewegt.

Es ergäbe sich bei einer Inaktivierung der gamma-Gene nach einer sigmoidalen Zeitkurve eine positive Korrelation der beiden Phänomene - Hb F zu Hb A Umschaltung und relativer (G)gamma-Globinanteil sowohl für den prae- als auch den postpartalen Zeitraum.

Biosynthetische Messungen werden vorangetrieben und sie werden mehr Klarheit in die Kinetik der Inaktivierung beider gamma-Globin-Gene bringen.

5. Zusammenfassung

Die Anteile von (G)gamma- und (A)gamma-Globin im Hämoglobin F wurden bei Kindern bis zum Alter von 189 Tagen bestimmt.

Das (G)gamma/((G)gamma+(A)gamma)-Verhältnis nahm in diesem Lebensabschnitt mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab, und es ergab sich eine gute Korrelation mit dem jeweils noch vorhandenem Anteil an Hämoglobin F, wohingegen sich bei Feten und Neugeborenen kein Unterschied in der gamma-Globin Zusammensetzung ergeben hatte (15,32).

Die beste Erklärung für den Verlauf der (G)gamma-Globin-Inaktivierung, mit dem sich die Meßwerte in Übereinstimmung bringen lassen, bietet ein sigmoidaler Kurvenverlauf. So könnte ein (G)gamma/((G)gamma+(A)gamma)-Verhältnis entstehen, das sich anfangs nur geringfügig ändert und später linear abnimmt.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Alter, B. P. (1979). The (G)gamma:(A)gamma composition of fetal hemoglobin in fetuses and newborns. *Blood* 54, 1158-1163
- 2) Alter, B. P., Modell, C. B., Fairweather, D. et al.: Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *N Engl J Med* 295 : 1437 (1976)
- 3) Bard, H. (1973) Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J Clin Invest* 52 : 1789
- 4) Beck, W. S. (ed.): Hematology. 2nd. ed. Boston, MIT Press, 1976
- 5) Betke, K.: Fetal hemoglobin in health and disease. *Proc. 8th Int. Congr. Hemat. Tokyo*, pp 1033 - 1040 (1960)
- 6) Bunn, H. F., Forget, B. G., Ranney, H. M.: Human hemoglobins. (1977) W. B. Saunders Company Philadelphia / London / Toronto
ISBN 0-7216-2178-3

- 7) Cividalli, G., Nathan, D. G., Fan, Y. W.,
 Santamaria, B. und F. Frigoletto: Relationship of
 beta to gamma synthesis during the first
 trimester. An approach to prenatal diagnosis of
 thalassemia. *Ped. Res.* 8, 553 (1974)

- 8) Clegg, J. B., Naughton, M. A., Weatherall, D. J.
 (1966). Abnormal human haemoglobins: separation
 and characterization of the alpha- and beta-
 -chains by chromatography, and the determination
 of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J
 (Bangkok). *J. Mol. Biol.* 19, 91-108

- 9) Comi, P., Siglioni, B., Ottolenghi, S. et al.
 (1980) Globin chain synthesis in single erythro-
 id bursts from cord blood: Studies on gamma to
 beta and (G)gamma to (A)gamma switches.
Proc Natl Acad Sci USA 77 : 362

- 10) G. Czihak, H. Langer, H. Ziegler: *Biologie*
 Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976
 ISBN 3-540-05727-7

- 11) Deisseroth, A., Nienhuis, A., Turner, P. et al.
 (1977) Localization of the human alpha globin
 structural gene to chromosome 16 in somatic cell
 hybrids by molecular hybridization assay. *Cell*
 12, 205-218.

- 12) Fritsch, E.F., Lawn, R.M., Maniatis, T.:
Molecular cloning and characterization of the
human beta-like globin gene cluster.
Cell 1980; 19: 959-972.
- 13) Huehns, E.R., Dance, N., Beaven, G.H., Hecht, F.,
und A.G. Motulsky: Human embryonic hemoglobins.
Gold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 19, 327
(1964)
- 14) Huehns, E.R., Hecht, F., Keil, K.V. und A.G.
Motulsky: Developmental hemoglobin anomalies in a
chromosomal triplication, D(1) trisomy syndrome.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 89 (1964)
- 15) Jensen, M.: Fetal globin synthesis and prenatal
diagnosis of thalassemia. 28th Int. Congress of
physiol. sciences, Budapest 1980, Adv. Physiol.
Sci. Vol. 6, 153 - 163
- 16) Jensen, M., Attenberger, H., Schneider, Ch., und
J.-U. Walther: The developmental change in the
(G)gamma- and (A)gamma- globin. Proportions in
hemoglobin F. Eur J Pediatr (1982) 138 : 311-314
- 17) Jensen, M., Rauch, A., Zahn, V., Loukopoulos, D.
(1979) Prenatal diagnosis of beta thalassemia.
Report an 14 attempts. Klin Wschr 57 : 37

- 18) Jensen, M. und V. Zahn : Pränataldiagnostik und genetische Beratung der Thalassämien.
Monatsschr. Kinderheilkd. 127, 711-713 (1979)
- 19) Koltsova, A., Fessas, P. und A. Stavropoulos:
Hemoglobins of early human embryonic development.
Science 153, 1417 (1966)
- 20) Kan, Y.W., Golbus, M.S., Trecartin, R., Furbetta, M., Cao, A.: Prenatal diagnosis of homozygous beta-thalassemia. Lancet II, 790, 1975
- 21) Kan, Y.W., Golbus, M.S.: Prenatal diagnosis of hereditary hemoglobin disorders: Current Developments. Fed. Res. 10, 367, 1975
- 22) Kazazian, H. H.: Regulation of fetal hemoglobin production. Sem. Hematol. 11, 525 (1974)
- 23) Kleihauer, E., Braun, H., Betke, K. (1957)
Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs. Klin. Wschr. 35, 635-636
- 24) Lauer, J., Shen, C-K.J., Maniatis, T.: The chromosomal arrangement of human alpha-like globin genes: Sequence homology and alpha-globin gene deletions. Cell 1980: 119-130.

- 25) Lebo, R.V., Carrano, A.V., Brukhardt-Schulze, K.
et al. (1979) Assignment of human beta-, gamma-,
and delta-globin genes to the short arm of chro-
mosome 11 by chromosome sorting and DNA restrict-
ion enzyme analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
76, 5804-5808
- 26) Drend, Karl Heinz: Die selektive Hämolyse von
adulten Erythrozyten in Mischungen mit fetalen
Erythrozyten und die Anwendung der Methode in der
pränatalen Diagnostik der beta-Thalassämie.
Inaugural-Dissertation, München 1980
- 27) Perutz, M.F.: Röntgenanalyse des Hämoglobins.
Angew. Chemie 75, 589 (1963)
- 28) Perutz, M.F.: The hemoglobin molecule.
Scientific American, Inc. (1964)
- 29) Rauch, A.: Globinsynthese in fetalen erythroiden
Zellen - Ausgangswerte für die pränatale
Diagnostik der beta-Thalassämie. Inaugural-
Dissertation, München 1982
- 30) Rovera, G., Maqarian, G., Borun, T.W. (1978)
Resolution of hemoglobin subunits by electro-
phoresis in acid urea polyacrylamide gels
containing Triton X-100. Anal. Biochem. 85 : 506

- 31) R.F. Schmidt und G. Thews: Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976 ISBN 3-540-08378-2

- 32) Schneider, Ch.: (G)gamma- und (A)gamma-Globine im Hamoglobin F von Feten und Neugeborenen und ihre Korrelation mit der Hb F - Hb A - Umschaltung. Inaugural-Dissertation, Munchen 1984

- 33) Schroeder, W.A., Shelton, J.B. Cormick, J., Jones, R.T.: The amino acid sequence of gamma-chain of human foetal hemoglobin. Biochem. 2, 922, (1963).

- 34) Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Kleihauer, E., Dozy, A.M. und B. Robberson: Evidence for multiple structural genes for the gamma-chain of human fetal hemoglobin. Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 537 (1968).

- 35) Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R., Wilson, J.B. (1970) An improved method for quantitative determination of human fetal haemoglobin. Anal. Biochem. 35, 235-243.

- 36) Schwartz, E.: Abnormal globin synthesis in thalassemic red cells. Sem. Hemat. 11, 594 (1974)

- 37) Siedenthaler: Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 38) Stryer Lubert: Biochemie/Lubert Stryer Dt. übers. von J. Guclielmi ... Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg, 1978. Einheitssacht.: Biochemistry <dt.> ISBN 3-528-08400-6
- 39) Stuart H. Orkin, Stylianos E. Antonarakis, and Haig H. Kazazian, Jr.: Polymorphism and molecular pathology of the human beta-globin gene. Progr. Hematol. 13, 1983
- 40) Terasawa, T., Ogawa, M.: Hemoglobin biosynthesis in individual bursts from human adult peripheral and umbilical cord blood: Analysis of the relative rates of synthesis of (G)gamma and (A)gamma globin chains. J Cell Physiol 105 : 483 (1980)
- 41) Terrenato, L., Bertilaccio, C., Spinelli, P., Colombo, B.: The switch from haemoglobin F to A: the time course of qualitative an quantitative variations of haemoglobins after birth. Brit J Haematol 47 : 31 (1981)
- 42) Weatherall, D. J., Pembrey, M. E., Pritchard, J. (1974) Fetal Haemoglobin. Clin. Haematol. Vol. 3, No. 2, 467 - 508

- 43) Wood, W. G. und D. J. Weatherall: Hemoglobin
synthesis during human fetal development. Nature
244, 162. (1973)

Lebenslauf

Hubert Attenberger,

geboren am 25. Oktober 1952 in Taufkirchen an der Vils
als erstes von fünf Kindern des Kaufmanns Josef Attenberger
und seiner Ehefrau Hilda, geborene Marketsmüller.

Verheiratet, zwei Kinder.

1957-1959	Kindergarten in Dorfen
1959-1963	Besuch der Volksschule in Dorfen
1963-1967	Internatsschüler am Gymnasium Marquartstein
1967-1973	Schulbesuch und Abitur am mathematisch- naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums Erding
1973-1974	Wehrdienst
1975-1976	Studium der Physik und Krankenhauspraktikum
1977	Angestellter im elterlichen Betrieb
1978-1984	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1984	Erteilung der Approbation
1985	Ass.-Arzt am KKrhs. Haag/Obb.

